Prüfung der Eigenschaften des

mit Laktoperoxydase und Chloramin T markierten ^{125}J-Gastrins im Radioimmunoassay

KLAUS DIETER SCHÖNROCK

Düsseldorf 1978

Aus der 1. Medizinischen Klinik A
der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. F. Grosse-Brockhoff

Prüfung der Eigenschaften des mit Laktoperoxydase und Chloramin T markierten ^{125}J-Gastrins im Radioimmunoassay

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

KLAUS DIETER SCHÖNROCK

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan
gez. Prof. Dr. A. Hopf

Referent
gez. Priv. Doz. Dr. W.-P. Fritsch

Korreferent
gez. Priv. Doz. Dr. D. Grüneklee

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544318_0018

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung und Fragestellung	1
2.	Methodik	4
2.1.	Prinzip des Gastrinradioimmunoassays	4
2.2.	Herstellung eines Antikörpers gegen Gastrin	5
2.3.	Radioaktive Markierung von Gastrin I (1-17) mit ^{125}J	5
2.3.1.	Markierung von SHG I mit Na-^{125}J unter Einwirkung von Chloramin T	6
2.3.2.	Markierung von SHG I mit Na-^{125}J unter Verwendung von Laktoperoxydase	7
2.4.	Säulenchromatographische Trennung von Gastrin-^{125}J und ^{125}Jodid mittels Sephadex G-10	9
2.5.	Ionenaustauscherchromatographie des Gastrin-^{125}J mit AE 41 Cellulose	10
2.6.	Aufbewahrung und Stabilisierung von Gastrin-^{125}J	12
2.7.	Überprüfung der Markierungen durch Ansatz von Eichkurven	12
2.8.	Immunologisches Verhalten des Tracerhormons im Antikörperüberschuß	14
2.9.	Trennung von antikörpergebundenem und freiem Gastrin	14
2.10.	Messung der Radioaktivität	15
2.11.	Transformation der Eichkurve in eine Gerade	15
3.	Ergebnisse	16
3.1.	Gewinnung des Antikörpers	16
3.2.	Radioaktive Markierung von Gastrin I mit Na-^{125}J unter Einwirkung von Chloramin T	16
3.3.	Radioaktive Markierung von Gastrin I mit Na-^{125}J unter Verwendung von Laktoperoxydase	16

3.3.1. Spezifische Aktivität bei Änderung der eingesetzten Gastrinmenge 18

3.3.2. Spezifische Aktivität bei Änderung der eingesetzten Laktoperoxydasemenge 18

3.3.3. Spezifische Aktivität bei Änderung der eingesetzten H_2O_2 Menge 18

3.3.4. Inkubationszeit 19

3.3.5. Einfluß der einzelnen Parameter auf die Steigerung der spezifischen Aktivität des SHG-^{125}J 19

3.4. Reinigung mit AE 41 Cellulose 19

3.5. Prüfung des immunologischen Verhaltens des Gastrin-^{125}J 27

3.5.1. Eichkurven mit Chloramin T markiertem SHG I-^{125}J 27

3.5.2. Eichkurven mit Laktoperoxydase markiertem SHG I-^{125}J 27

3.5.3. Eichkurven nach Rechromatographie des SHG I-^{125}J mit AE 41 Cellulose 31

3.5.4. Immunologisches Verhalten des markierten Gastrin-^{125}J im Antikörperüberschuß 34

4. Diskussion 36

4.1. Radioaktive Markierung von Gastrin I mit ^{125}J unter Verwendung von Laktoperoxydase 36

4.1.1. Änderung der eingesetzten Hormonmenge 36

4.1.2. Änderung der eingesetzten Laktoperoxydasekonzentration 37

4.1.3. Änderung der eingesetzten H_2O_2 Konzentration 37

4.1.4. Änderung der Inkubationszeit 39

4.2. Rechromatographie von Gastrin-^{125}J mit AE 41 Cellulose 39

4.3. Vorteile der enzymatischen Markierung von Gastrin mit ^{125}J 39

5. Zusammenfassung 41

6. Literaturverzeichnis 42

1. Einleitung

Im Jahre 1905 beschrieb Edkins (5) ein gastrointestinales Hormon, das die Magensäuresekretion stimulierte. Vorangegangene Versuche hatten gezeigt, daß Extrakte der Magenschleimhaut die Magensäuresekretion bei anästhesierten Katzen steigerten. Dieses Hormon wurde von Edkins Gastrin genannt. Schon bald wurde diese Hypothese in Frage gestellt, da auch andere Organextrakte die Magensäuresekretion stimulierten (4, 21, 39). Als wirksamer Stoff wurde Histamin angenommen (4, 21, 39, 43). Erst im Jahre 1938 konnte der Beweis für die Existenz des Gastrins erbracht werden. Komarow (24) konnte zeigen, daß histaminfreie Organextrakte, hergestellt durch Fällung mit TCE, eine Steigerung der Magensäuresekretion bewirkten.

Anfang der sechziger Jahre konnte die Arbeitsgruppe von Gregory und Tracy (14) Gastrin in reiner Form isolieren und in seiner Struktur völlig aufklären. Es handelt sich um zwei Polypeptidhormone (Gastrin I und Gastrin II) mit 17 Aminosäureresten (Abb.1). Die Aminosäuresequenz ist bei Gastrin I und II identisch, jedoch liegt bei Gastrin II Tyrosinsulfat anstelle von Tyrosin in Position 12 der Aminosäurekette vor.

1964 konnte biologisch aktives Gastrin von der Arbeitsgruppe um Kenner (1) synthetisiert werden. Die biologische Aktivität des Gastrinmoleküls ist an das C-terminale Tetrapeptid gebunden (32), dessen Aminosäuresequenz sich auch bei dem gastrointestinalen Hormon Cholecystokinin-Pankreozymin (CCK-PZ) fand (35). Die Polypeptide Caerulein und Phytocaerulein, die in der Haut des Frosches Hyla caerula entdeckt wurden, besitzen ebenfalls eine magenstimulierende Wirkung und stimmen in ihrem C-terminalen Tetrapeptid mit der Aminosäuresequenz des C-terminalen Tetrapeptids des Gastrinmoleküls überein (Abb. 1).

Aminosäurensequenz von Gastrin I, Cholecystokinin-Pankreo-Zymin und Caerulein

Gastrin I

Glu-Gly-Pro-Try-Leu-Glu(5)-Ala-Tyr-Gly-[Try-Met-Asp-Phe(NH_2)]

CCK-PZ

(C-terminales Ende) Asp-Tyr(SO_3)-Met-Gly-[Try-Met-Asp-Phe(NH_2)]

Caerulein

Glu-Gln-Asp-Tyr(SO_3)-Thr-Gly-[Try-Met-Asp-Phe(NH_2)]

Abb. 1

Hauptbildungsort des Gastrins sind die G-Zellen der Antrumschleimhaut und des oberen Dünndarms (3, 6, 25, 29, 36). Immunfluoreszenzmikroskopisch konnten gastrinhaltigen Zellen in den Inseln des menschlichen Pankreas dargestellt werden (16, 26). Nach histochemischen Untersuchungen handelte es sich dabei um D-Zellen (31). Die Gastrinfreisetzung erfolgt einmal über den N. vagus (22, 38), zum anderen über lokale chemische und mechanische Reize an der Antrumschleimhaut. Die Regulation der Gastrinsekretion erfolgt über einen Autoregulationsmechanismus (49, 51). Die Gastrinfreisetzung wird durch den Abfall des pH Wertes im Antrum (pH kleiner als 3) gehemmt (49, 50, 51).

Die Bestimmung des Gastrins im Serum erfolgte vor der Entwicklung des Radioimmunoassays mit biologischen Methoden (17, 25, 44, 48). Die Ergebnisse waren schlecht reproduzierbar, außerdem konnte wegen der geringen Empfindlichkeit der biologischen Tests der normale Serumgastrinspie-

gel nicht bestimmt werden. Erst mit Hilfe eines empfindlichen Radioimmunoassays für Gastrin gelang McGuigan (28) und später auch zahlreichen anderen Arbeitsgruppen (8, 9, 11, 18, 37, 40, 46) die Bestimmung physiologischer Serumgastrinkonzentrationen. Zur Durchführung des Gastrinradioimmunoassays wird mit ^{125}Jod markiertes Gastrin I (2-17) benötigt. Bisher wurde diese Markierung in Anlehnung an die von Hunter und Greenwood (11, 20) angegebene Methode durchgeführt. Eine andere Methode wurde 1972 von Holohan et al. (19) angegeben. Dabei wurde Gastrin I (2-17) auf enzymatischem Wege unter Verwendung von Laktoperoxydase und H_2O_2 markiert. Nach der Mitteilung von Holohan hatte dieses Gastrin bessere immunologische Eigenschaften.

Fragestellung: 1. Besitzt enzymatisch markiertes Gastrin-^{125}J Eigenschaften, die zur Verbesserung des Radioimmunoassays führen?

2. Ist durch Rechromatographie des markierten Gastrins eine Verbesserung der immunologischen Eigenschaften zu erreichen?

Die Methode der Rechromatographie von radioaktiv markiertem Gastrin zur Erzielung eines höheren Reinheitsgrades des Tracerhormons wurde von Stadil und Rehfield 1972 (45) angegeben.

2. Methodik

2.1. Prinzip des Gastrinradioimmunoassays

Die Konzentration von Hormonen im menschlichen Blut ist so gering, daß sie mit herkömmlichen klinisch-chemischen Methoden nicht erfaßt werden kann. Berson und Yalow entwickelten im Jahre 1959 erstmals das Prinzip des Radioimmunoassays zur Bestimmung von Insulin (2). Dieses Verfahren der Hormonbestimmung wurde von McGuigan 1968 erstmalig unter Verwendung von ^{125}J markiertem Gastrin erfolgreich zur Bestimmung der Serumgastrinkonzentration benutzt (30).

Das Prinzip des Gastrinradioimmunoassays besteht darin, daß unmarkiertes Gastrin und mit ^{125}Jod markiertes Gastrin um Bindungsstellen an einem Antikörper gegen Gastrin konkurrieren. Die Zugabe von unmarkiertem Hormon zum Testansatz vor Beginn der Inkubationszeit bewirkt durch kompetitive Verdrängung eine Verminderung des antikörpergebundenen markierten Gastrins. Nach Beendigung der Inkubationszeit werden antikörpergebundenes und freies Gastrin getrennt. Die Radioaktivität in beiden Fraktionen wird gemessen. Durch Einsatz definierter unterschiedlicher Mengen von nicht markiertem synthetischem Gastrin oder Schweinegastrin ist die Erstellung einer Eichkurve möglich. Zur radioimmunologischen Serumgastrinbestimmung wird an Stelle des unmarkierten Gastrins Serum eingesetzt.

Die Spezifität und die Empfindlichkeit des Radioimmunoassays werden bestimmt von den Eigenschaften des markierten Gastrins, des Antikörpers und den Testbedingungen. Voraussetzung dafür aber ist, daß sich synthetisches Gastrin und Serumgastrin immunologisch gleich verhalten.

2.2. Herstellung eines Antikörpers gegen Gastrin

Die antigenen Eigenschaften sind bei reinem synthetischem Gastrin nur schwach ausgeprägt (37, 47). Zur Erzeugung hoher Antikörperspiegel werden bei der Immunisierung ungereinigte Gastrinpräparationen (59) und an ein Trägermolekül gekoppeltes synthetisches Gastrin verwendet (47). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Antikörper verwandt, der nach den Angaben von McGuigan hergestellt worden war (2, 10, 11, 14). Synthetisches menschliches Gastrin I (2-17) wurde an Rinderserumalbumin gekoppelt, wobei ein Carbodiimidderivat als Kopplungsreagenz diente (12). Das Konjugat aus SHG I (2-17) und Rinderserumalbumin wurde mit kompletten Freundschem Adjuvans Kaninchen subcutan injiziert (28, 41, 53).

2.3. Radioaktive Markierung von Gastrin I (1-17) mit ^{125}Jod

Gastrin besitzt in Position 12 seiner Aminosäurekette einen Tyrosinrest (Abb. 1). An den Benzolring dieses Tyrosinrestes können durch Additionsreaktion Halogenmoleküle angelagert werden. Zu diesem Zweck wird ^{125}Jodid durch ein geeignetes Oxydationsmittel zu ^{125}Jod oxydiert. Das nicht eingebaute ^{125}Jod wird am Ende der Reaktion wieder zu ^{125}Jodid reduziert. Durch ein geeignetes Trennmittel wird das nicht eingebaute ^{125}Jodid von dem markierten Hormon getrennt. Die Markierung hat zum Ziel, eine möglichst hohe spezifische Aktivität des markierten Hormons zu erreichen, ohne daß die immunologischen Eigenschaften verändert werden (2).

2.3.1. Markierung von SHG I mit Na-^{125}J unter Einwirkung von Chloramin T

Als Standardmethode zur Markierung von SHG I diente eine Modifikation der Methode von Hunter und Greenwood (1962) (13, 38).

Reagenzien:

1. 1 mCi Na-^{125}J (Hoechst), spezifische Aktivität 8-15 mCi ^{125}J/mg Jod
2. Synthetisches menschliches Gastrin I (SHG I; 1-17, Imperial Chemical Corp., Macclesfield, Cheshire, England)
3. Chloramin T p.a. (Merck)
4. Natriumdisulfit $Na_2S_2O_5$, p.a. (Merck)
5. Kaliumjodid, KJ, p.a. (Merck)
6. KH_3PO_4, p.a. (Merck)
7. K_3PO_4, p.a. (Merck)
8. Dimethylsulfoxyd (für Spektroskopie; Merck)
9. Sephadex G-10 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden)
10. Ovalbumin, kristallisiert und lyophilisiert (Grade V, Sigma, St. Louis, USA)

Lösungen:

I. 1 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,4
II. 0,5 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,4
III. Oxydationslösung (25 mg Chloramin T/10 ml 0,5 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,4)
IV. Reduktionslösung (20 mg Natriumdisulfit/ 10 ml 0,5 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,4)
V. Kaliumjodidlösung (10 mg Kaliumjodid/ml 0,5 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,4)

Arbeitsweise:

In ein Eppendorf Reaktionsgefäß werden folgende Lösungen gegeben:

- 1,5 ug SHG I in 15 ul 0,5 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 (11)
- 80 ul 1 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 (1)
- 20 ul Dimethylsulfoxyd (8)
- 1 mCi Na-^{125}J (1)
- 50 ug Chloramin T in 20 ul 1 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 (111)

Diese Lösungen werden gründlich miteinander vermischt. 30 Sekunden nach Zugabe des Chloramin T wird die Reaktion durch Zugabe von

- 100 ug Natriumdisulfit in 50 ul 0,5 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 (IV)

gestoppt. Mit dieser Reduktionslösung wird das nicht eingebaute ^{125}Jod wieder zu ^{125}Jodid reduziert. Anschließend wird die Reaktionslösung durch Zugabe von 200 ul Kaliumjodidlösung (V) verdünnt und auf eine Chromatographiesäule aufgetragen.

2.3.2. Markierung von SHG I mit Na-^{125}J unter Verwendung von Laktoperoxydase

Eine andere Methode Gastrin mit ^{125}J zu markieren besteht in einer enzymatischen Reaktion unter Einwirkung von Laktoperoxydase. Dieses Vorgehen wurde von Holohan et al (19) 1972 angegeben.
Bei dieser Methode wird ebenfalls ^{125}Jod durch eine Additionsreaktion an den Benzolring des Tyrosinrestes in Position 12 des Gastrinmoleküls (Abb. 1) angelagert. Diese Anlagerung und die vorher notwendige Oxydation des ^{125}Jodid zu ^{125}Jod wird nicht mit Chloramin T durchgeführt sondern

mit Laktoperoxydase und Wasserstoffperoxyd in verdünnter Lösung. Das pH Optimum dieser Reaktion liegt bei 5,0 (19).

Reagenzien:

1. 1 mCi Na-^{125}J (Hoechst), spezifische Aktivität 8 - 15 mCi ^{125}J/mg Jod (entspr. 2.3.1.)
2. Synthetisches menschliches Gastrin I (SHG I, 1 - 17, Imperial Chemical Corp., Macclesfield, Cheshire, England), (entspr. 2.3.1.)
3. Laktoperoxydase (Sigma, St. Louis, USA)
4. H_2O_2, 30 %, (Perhydrol, Merck)
5. Natriumdisulfit, $Na_2S_2O_5$, (Merck), (entspr. 2.3.1.)
6. Kaliumjodid, KJ, (Merck, entspr. 2.3.1.)
7. KH_2PO_4, (Merck,entspr. 2.3.1.)
8. K_3PO_4, (Merck, entspr. 2.3.1.)
9. NaH_2PO_4, p.a. (Merck)
10. Na_2HPO_4, p.a. (Merck)
11. Natriumacetat, CH_3COONa, p.a., (Merck)
12. Essigsäure, CH_3COOH, (Eisessig, Merck)
13. Sephadex G-10 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden, entspr. 2.3.1.)
14. Ovalbumin, kristallisiert und lyophilisiert, Grade V (Sigma, St. Louis, USA)

Lösungen:

I. 0,1 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,4
II. 0,5 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 (entspr. 2.3.1.)
III. 0,05 m Natriumacetatpuffer pH 5,0
IV. 0,2 m Natriumphosphatpuffer pH 7,4
V. Oxydationslösung (1 ml H_2O_2, 30 %, mit Aqua bidest auf 1000 ml aufgefüllt)
VI. Laktoperoxydase (500 ug Laktoperoxydase/ml 0,05 m Natriumacetatpuffer pH 5,0 (III))
VII. Reduktionslösung (50 mg Natriumdisulfit/100 ml 0,2 m Natriumphosphatpuffer pH 7,4 (IV))

VIII. Kaliumjodidlösung (311 mg KJ/10 ml 0,2 m Natriumphosphatpuffer pH 7,4 (IV))

Arbeitsweise:

In ein Eppendorf Reaktionsgefäß mit 15 ul SHG Lösung (0,25 - 1,5 ug SHG I/15 ul 0,5 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 (II) werden folgende Lösungen gegeben:

35 ul 0,05 m Natriumacetatpuffer pH 5,0 (III)

20 ul Laktoperoxydase (VI)

10 ul H_2O_2 (V)

Diese Lösungen werden gründlich durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Zimmertemperatur wird die Reaktion gestoppt durch Zugabe von:

- 100 ul Natriumdisulfit (VII)

Nach sorgfältigem Vermischen wird die Reaktionslösung mit 200 ul Kaliumjodidlösung verdünnt und auf die Chromatographiesäule aufgetragen.

Zur Erarbeitung optimaler Markierungsbedingungen wurden folgende Parameter im Markierungsansatz variiert:

1. Hormonmenge
2. Laktoperoxydasemenge
3. H_2O_2 Konzentration
4. Inkubationszeit

2.4. Säulenchromatographische Trennung von Gastrin-^{125}J und ^{125}Jodid mittels Sephadex G-10

Gastrin-^{125}Jod und ^{125}Jodid lassen sich auf Grund ihrer unterschiedlichen Molekülgrößen mit Hilfe der Säulenchromatographie trennen (11, 18, 28). Die chromatographische Trennung erfolgt mit Hilfe einer Säule (0,9 cm x 15 cm, Pharmacia K 9), die mit Sephadex G-10 gefüllt wird. Da dieses Gel eine Ausschlußgrenze für Teilchen mit einem Molekulargewicht über 700 hat, erscheint Gastrin-^{125}J im

Ausschlußvolumen Vo, während das ^{125}Jodid auf Grund seines niedrigen Molekulargewichtes die Säule erst nach einem Volumen verläßt, das dem Volumen der ganzen Säule entspricht (V_T). Als Elutionsmittel dient 0,1 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,4.

Vorbereitung der Säule:

10 g Sephadex G-10 werden mit etwa 100 ml 0,1 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 gründlich gemischt. Bei Zimmertemperatur beträgt die Quellzeit des Gels ca. 3 Stunden. Nach dem Quellen wird der Überstand abgesaugt und das Gefäß viermal mit dem gleichen Puffer gefüllt und durchmischt. Das so vorbereitete Gel wird dann in die Säule gefüllt und ca. 24 Stunden bei 4 Grad Celsius mit 0,1 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 gewaschen. Anschließend ist die Säule gebrauchsfertig.

Chromatographie:

Sofort nach Beenden des Markierungsvorganges wird das Inkubationsgemisch auf die vorbereitete Sephadex G-10 Säule aufgetragen. Danach wird die Säule mit 0,1 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 bis zum oberen Rand gefüllt und mit der Vorratsflasche verbunden. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 0,25 ml/Minute. Das Eluat wird im Fraktionssammler in Fraktionen von jeweils 800 ul gesammelt. Zur Bestimmung der Radioaktivität in jeder Fraktion werden 10 ul Eluat im automatischen Scintillationszähler mit Probenwechsler (Friseke und Höpfner, Erlangen) gemessen.

2.9. Ionenaustauscherchromatographie des Gastrin-^{125}J mit AE 41 Cellulose

Für eine möglichst weitgehende Entfernung der markierten Degradationsprodukte des Gastrinmoleküls kann der chromatographischen Trennung des markierten Gastrins vom

^{125}Jodid mit der Sephadex G-10 Säule ein Reinigungsschritt unter Verwendung einer mit AE 41 Cellulose gefüllten Säule (0,9 cm x 15 cm, Pharmacia K 9) angeschlossen werden. (Stadil und Rehfield, 1972 (45)). Zur Elution wird das Elutionsmittel über ein Gradientengefäß in linear ansteigendem Molaritätsgradienten auf die Säule gegeben.

Reagenzien:

1. AE 41 Cellulose
2. Ammoniumhydrogencarbonat (Merck)

Apparate:

Elutionsgradientenapparat (Pharmacia GM1, Uppsala,Schweden)

Lösungen:

I. 0,05 m Ammoniumhydrogencarbonatlösung
II. 0,4 m Ammoniumhydrogencarbonatlösung

Vorbereitung der Säule:

AE 41 Cellulose wird 24 Stunden mit einer 0,05 m Ammoniumhydrogencarbonatlösung äquilibriert. Nach dieser Zeit wird der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Gefäß anschließend viermal mit der gleichen Lösung aufgefüllt und durchmischt. Nach dieser Vorbereitung wird die Cellulose in die Säule eingefüllt und ca. 24 Stunden bei 4 Grad Celsius mit 0,05 m Ammoniumhydrogencarbonatlösung (I) gewaschen. Anschließend ist die Säule gebrauchsfertig. Jede Säulenfüllung wurde nur einmal verwandt.

Füllung des Elutionsgradientenapparates:

Zylinder 1 wird mit 100 ml 0,4 Ammoniumhydrogencarbonatlösung (II) gefüllt, Zylinder 2 mit 100 ml 0,05 m Ammoniumhydrogencarbonatlösung (I). Der Verbindungsschlauch zwischen beiden Zylindern bleibt bis zum Anschluß von Zylinder 2 an die Säule gesperrt.

Arbeitsweise:

Auf die vorbereitete AE 41 Cellulosesäule werden 500 ul Gastrin-^{125}J aufgetragen. Anschließend wird die Säule mit 0,05 m Ammoniumhydrogencarbonatlösung (I) bis zum oberen Rand gefüllt und an Zylinder 2 des Elutionsgradientenapparates angeschlossen. Der Verbindungsschlauch zwischen den Zylindern wird geöffnet. Im Fraktionssammler werden Fraktionen zu je 2,0 ml gesammelt. Von jeder Fraktion werden zu Bestimmung der Radioaktivität 10 ul im automatischen Scintillationszähler mit Probenwechsler (Friseke und Höpfner, Erlangen) gemessen.

2.6. Aufbewahrung und Stabilisierung von Gastrin-^{125}J

Die Haltbarkeit markierter Hormone kann durch Aufbewahrung in eiweißhaltigen Lösungen verlängert werden. Für Gastrin-^{125}J hat sich die Aufbewahrung in einer Ovalbuminlösung bewährt (52). Auch das im Rahmen dieser Arbeit anfallende Gastrin-^{125}J wurde in dieser Lösung bei - 20 Grad Celsius aufbewahrt. Alle Versuche mit dem so aufbewahrten Gastrin-^{125}J wurden innerhalb von 6 Tagen nach der Markierung durchgeführt.

Arbeitsweise:

Das mit ^{125}J markierte Gastrin wird mit einer Ovalbuminlösung (5 mg Ovalbumin V Sigma/ml 0,02 m Barbitalpuffer pH 8,4) 1:40 verdünnt. Diese Lösung wird in 1 ml Portionen bei - 20 Grad Celsius gelagert.

2.7. Überprüfung der Markierungen durch Ansatz von Eichkurven

Die immunologische Qualität des markierten Gastrins wird mit Hilfe von Eichkurven geprüft.

Als Beurteilungskriterien dienten:

a. maximale Bindung des markierten Gastrins an den Antikörper bei verschiedenen Antikörperverdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000, 1:4000)
b. Steilheit der Eichkurve
c. Empfindlichkeit der Eichkurve durch Bestimmung der unteren Nachweisgrenze (18, 34).

Folgende Reagenzien und Lösungen sind für die Durchführung des Gastrinradioimmunoassays notwendig (2):

1. Gastrin-^{125}J (ca. 3000 counts/min. in 0,1 ml 0,02 m Barbitalpuffer pH 8,4)
2. Gastrinantiserum verdünnt auf 1:4000 mit 0,02 m Barbitalpuffer pH 8,4
3. Gastrinstandardlösung (10 bis 200 pg SHG 1/0 1 ml 0,02 m Barbitalpuffer pH 8,4)
4. Standardverdünnungsmittel (13,2 mg Ovalbumin/ml 0,02 m Barbitalpuffer pH 8,4 und 0,15 m NaCl)
5. Amberlite CG-400 1, OH Form (Kapseln mit je 250 mg Ionenaustauscher in der Ergänzungspackung zum Radioimmunbesteck Insulin, Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt/Main)

Zur Erstellung einer Eichkurve für die radioimmunologische Gastrinbestimmung dient folgender Testansatz mit einem Inkubationsvolumen von 2,5 ml:

- 0,1 ml Gastrin-^{125}J (3000 cpm in 0,1 ml 0,02 Barbitalpuffer pH 8,4
- 0,1 ml Gastrinantiserum (1:4000 verdünnt)
- 0,1 ml Gastrinstandardlösung
- Standardverdünnungsmittel ad 2,5 ml

Die Inkubation im verschlossenen Inkubationsgefäß erfolgt bei 4 Grad Celsius über 72 Stunden.

2.8. Immunologisches Verhalten des Tracerhormons im Antikörperüberschuß

Die Überprüfung des Verhaltens des markierten Gastrins im Antikörperüberschuß erfolgte durch folgenden Testansatz:

- 0,1 ml Gastrin-^{125}J (3000 cpm) in 0,1 ml 0,02 m Barbitalpuffer pH 8,4
- 0,1 ml Gastrinantiserum (Verdünnung 1:10, 1:100, 1:1000, 1:4000 mit 0,02 m Barbitalpuffer pH 8,4)
- Standardverdünnungsmittel ad 2,5 ml

Die Inkubationszeit beträgt 72 Stunden bei 4 Grad Celsius.

2.9. Trennung von antikörpergebundenem und freiem Gastrin

Nach der Inkubationszeit werden in jedem Testansatz antikörpergebundenes und freies Gastrin durch Verwendung des Ionenaustauschers Amberlite CG-400 1 OH Form (Hoechst, Frankfurt/Main) getrennt. Durch das Ionenaustauscherharz wird freies Gastrin im Gegensatz zum antikörpergebundenen Gastrin schnell und zu über 95 % gebunden.

Arbeitsweise:

50 mg Ionenaustauscherharz werden dem Inkubationsansatz zugegeben. Trennmittel und Inkubationsansatz werden durch Rotation bei Zimmertemperatur für 10 Minuten gründlich durchmischt. Nach anschließendem Zentrifugieren bei 4 Grad Celsius und 2500 g für 15 Minuten können Überstand (antikörpergebundenes Gastrin) und Sediment (freies Gastrin) durch Dekantieren des Überstandes getrennt werden.

2.10. Messung der Radioaktivität

Die Radioaktivität in Überstand und Sediment wird im automatischen Scintillationszähler mit Probenwechsler (Frieseke und Höpfner, Erlangen) gemessen. Aus den Meßergebnissen, ausgedruckt als Counts pro 15 Minuten, wird die Radioaktivität des antikörpergebundenen Gastrins in Prozent der eingesetzten Gesamtradioaktivität errechnet.

2.11. Transformation der Eichkurve in eine Gerade

Bei Auftragung im einfachen Koordinatensystem hat die Eichkurve einen S-förmigen Verlauf. Eine Begradigung ist durch Auftragen in einem semilogarithmischen System möglich. Bei dieser Transformation ergibt sich ein durchschnittlicher Korrelationskoeffizient von r = - 0,995 (10, 34, 42).

3. Ergebnisse

3.1. Gewinnung des Antikörpers

Für die Erstellung von Eichkurven zur Prüfung des immunologischen Verhaltens des markierten Gastrins wurde der Antikörper 662 verwandt. Die Endverdünnung des Antikörpers für den Eichkurvenansatz betrug 1:100000. Diese Antikörperverdünnung wird auch für die routinemäßige Serumgastrinbestimmung benutzt.

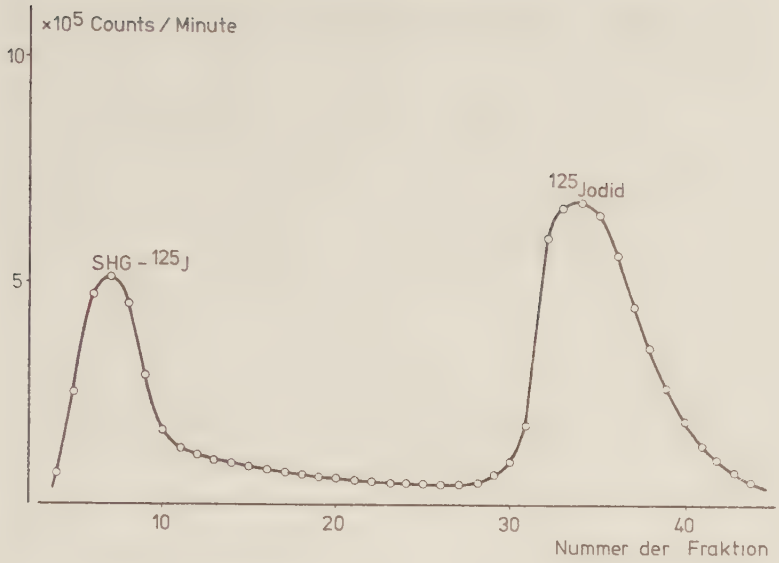
3.2. Radioaktive Markierung von Gastrin I mit ^{125}J unter Einwirkung von Chloramin T

Die für den Vergleich mit der enzymatischen Methode benutzten Gastrinmarkierungen mit ^{125}J und Chloramin T entsprachen im Alter und einer Altersdifferenz von maximal 4 Tagen dem enzymatisch markierten Tracerhormon. Die spezifische Aktivität des markierten Gastrins lag zwischen 90,5 und 123,0 uCi/ug SHG-^{125}J (199,1 und 270,6 uCi/nmol SHG-^{125}J). Die spezifische Aktivität wurde unter der Voraussetzung einer vollständigen Recovery beim Trennen über Sephadex G-10 errechnet. Für die Eichkurve wurde SHG-^{125}J aus dem abfallenden Schenkel des Peptidpeaks verwandt. Diese Gastrinfraktion erzielte die höchste prozentuale Bindung an den Antikörper (10, 23, 33) (Abb.2).

3.3. Radioaktive Markierung von Gastrin I mit ^{125}J unter Verwendung von Laktoperoxydase

Für die Erarbeitung optimaler Markierungsbedingungen wurden folgende Parameter im Markierungsansatz variiert:

1. Hormonmenge
2. Laktoperoxydasemenge
3. H_2O_2 Konzentration
4. Inkubationszeit



Chromatographische Trennung von Gastrin-^{125}Jod und freiem ^{125}Jodid über Sephadex G-10

Ordinate: Counts pro Minute in 0,01 ml jeder Fraktion
Abszisse: Nummer der Fraktion (jeweils Fraktionen zu 0,8 ml)

Abb. 2

3.3.1. Spezifische Aktivität bei Änderung der eingesetzten Gastrinmenge

Die Hormonmenge wurde in den Bereichen von 0,1 ug SHG/15 ul 0,5 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 bis 1,5 ug SHG/15 ul 0,5 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 variiert. Die erzielte spezifische Aktivität lag zwischen 27, 4 uCi/ug SHG-^{125}J und 2397,0 uCi/ug SHG-^{125}J (60,28 uCi/nmol SHG und 5273,4 uCi/nmol SHG-^{125}J). Bei Reduktion der im Markierungsansatz eingesetzten Hormonmenge ergab sich eine Steigerung der spezifischen Aktivität des markierten Gastrins (Abb.3).

Eine Selbstmarkierung des Enzyms konnte bei der Rechromatographie von SHG-^{125}J mit Sephadex G-50 nur in geringem Maße nachgewiesen werden (Abb. 4).

3.3.2. Spezifische Aktivität bei Änderung der eingesetzten Laktoperoxydasemenge

Die Konzentration der eingesetzten Laktoperoxydasemenge wurde zwischen 50 ug Laktoperoxydase/ml 0,05 m Natriumacetatpuffer pH 5,0 und 500 ug Laktoperoxydase/ml 0,05 m Natriumacetatpuffer pH 5,0 verändert. Die spezifische Aktivität des markierten Gastrins nahm mit ansteigender Laktoperoxydasekonzentration zu. Abb. 5 zeigt die Elutionskurve bei Laktoperoxydasekonzentrationen von 50 und 5000 ug/ml 0,05 m Natriumacetatpuffer pH 5,0 bei sonst gleichem Markierungsansatz.

3.3.3. Spezifische Aktivität bei Änderung der eingesetzten H_2O_2 Menge

Es wurden sowohl Konzentration und eingesetzte Gesamtmenge an H_2O_2 verändert. 30%iges H_2O_2 wurde in Verdünnungen von 1:1000 und 1:10000 und in Mengen von 10 ul bis 90 ul (Verdünnung sowohl 1:1000 als auch 1:10000) eingesetzt.

Wurde mehr als 10 ul H_2O_2 verwandt, so erfolgte in fünfminütigem Abstand die Zugabe von jeweils weiteren 10 ul H_2O_2. Abb. 6 zeigt die Elutionskurve einer Markierung mit 30 ul einer 1:10000 verdünnten H_2O_2 Lösung bei sonst gleichem Markierungsansatz. Die optimale Menge und Konzentration zur Erzielung hoher spezifischer Aktivitäten des markierten Gastrins liegt bei 10 ul einer 1:1000 mit Aqua bidest verdünnten H_2O_2 Lösung.

3.3.4. Inkubationszeit

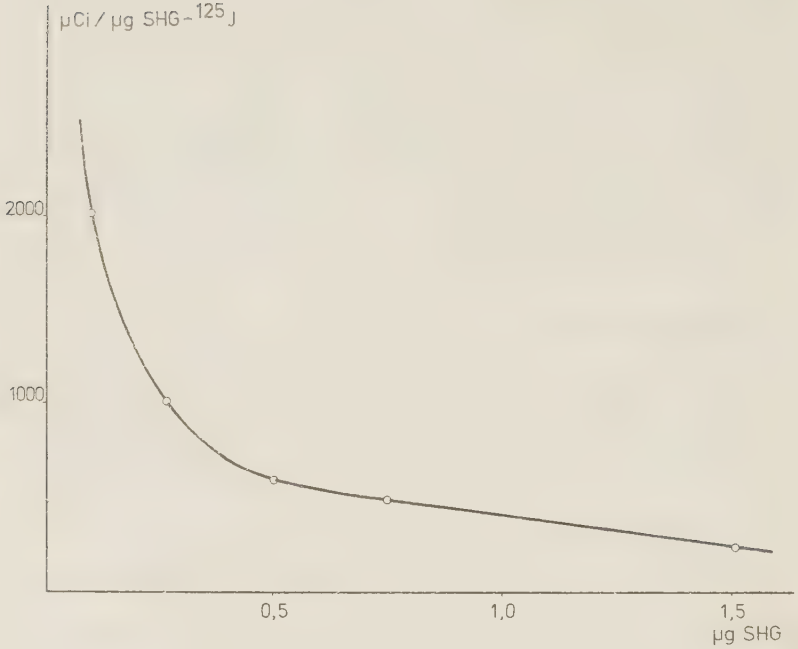
Die Inkubationszeit wurde zwischen 15 und 45 Minuten variiert. Die Verlängerung der Inkubationszeit und auch mehrfache Zugabe von H_2O_2 in fünfminütigen Abständen bei Inkubationszeiten von 15 bis 45 Minuten führten zu keiner Steigerung der spezifischen Aktivität des markierten Gastrins.

3.3.5. Einfluß der einzelnen Parameter auf die Steigerung der spezifischen Aktivität des SHG-^{125}J

Durch Erhöhung der Laktoperoxydase und der H_2O_2-Konzentration ist ein Anstieg der spezifischen Aktivität des markierten Gastrin bis 243,6 uCi/ug SHG-^{125}J (535,9 uCi/nmol SHG-^{125}J) zu erreichen. Darüber hinaus ist eine Steigerung der spezifischen Aktivität nur durch Reduktion der eingesetzten Hormonmenge im Markierungsansatz möglich.

3.4. Reinigung mit AE 41 Cellulose

Mit Chloramin T und Laktoperoxydase markiertes SHG-^{125}J wurde im Anschluß an die Markierung auf die AE 41 Cellulosesäule aufgetragen. Das Elutionsdiagramm des Reinigungsschrittes zeigt zwei Peaks. Die Radioaktivität im ersten

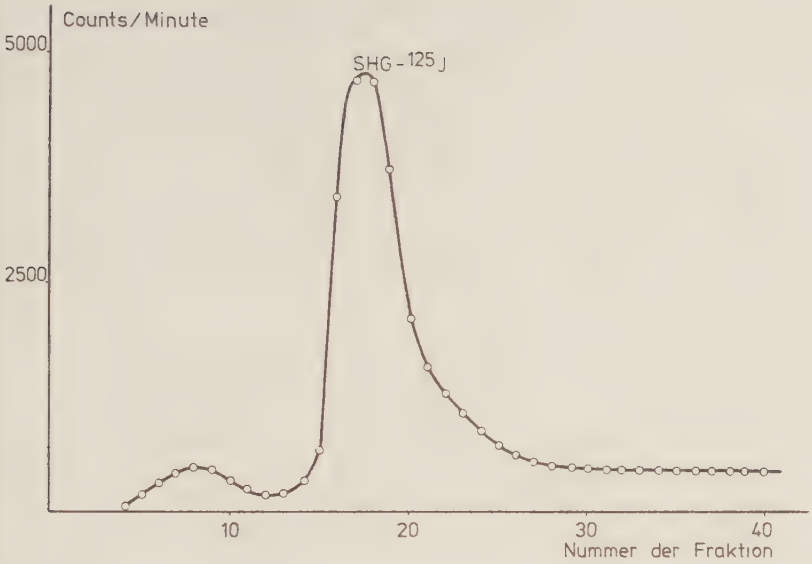


Beziehung zwischen eingesetzter Hormonmenge im Markierungsansatz und spezifischer Aktivität des markierten Gastrins

Ordinate: spezifische Aktivität des markierten Gastrins in uCi/ug SHG-^{125}J

Abszisse: eingesetzte Hormonmenge im Markierungsansatz

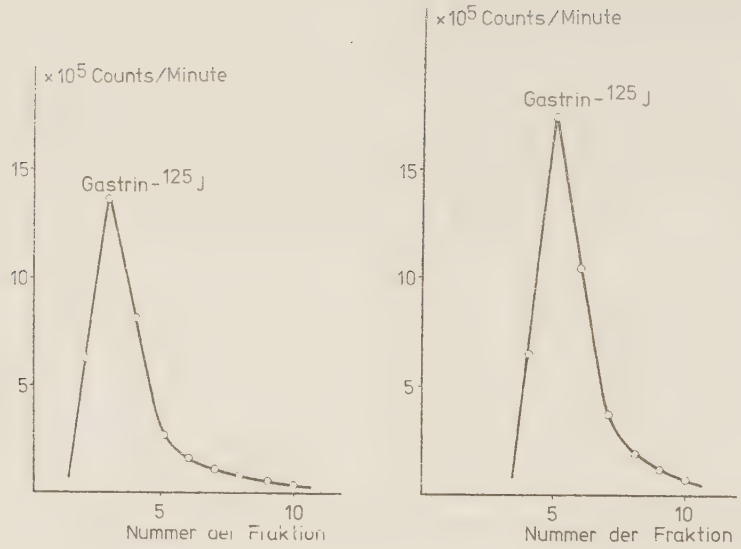
Abb. 3



Rechromatographie von Gastrin-^{125}J, markiert nach enzymatischer Methode, über Sephadex G-50 (Säule 0,9 x 30 cm)

Ordinate: Counts pro Minute in 0,01 ml jeder Fraktion
Abszisse: Nummer der Fraktion (jeweils Fraktionen zu 1,6 ml)

Abb. 4



Elutionskurve zweier Gastrinmarkierungen nach enzymatischer Methode.

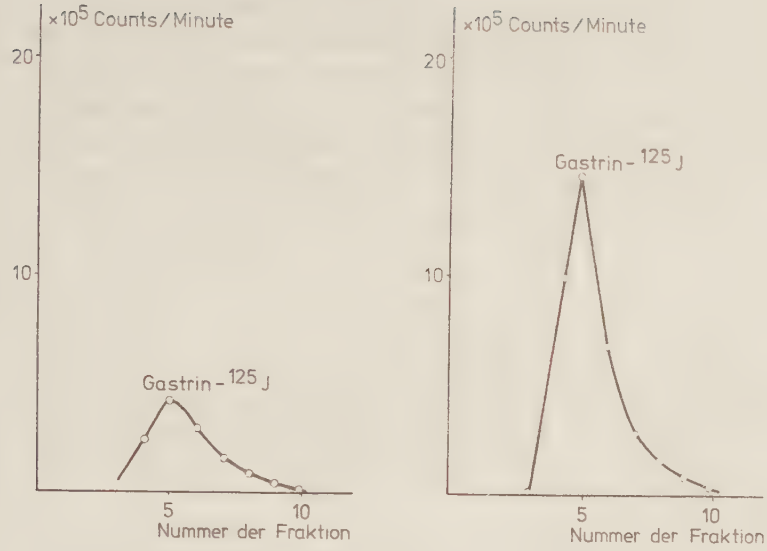
Links: Markierungsansatz mit 50 ug Laktoperoxydase/ml 0,05 m Natriumacetatpuffer pH 5,0; 10 ul H_2O_2 1:1000; 0,75 ug SHG.

Rechts: Markierungsansatz mit 500 ug Laktoperoxydase/ml 0,05 m Natriumacetatpuffer pH 5,0; 10 ul H_2O_2 1:1000; 0,75 ug SHG.

Ordinate: Counts pro Minute in 0,01 ml jeder Fraktion

Abszisse: Nummer der Fraktion (jeweils Fraktionen zu 0,8 ml)

Abb. 5



Elutionskurve zweier Gastrinmarkierungen nach enzymatischer Methode.

Links: Markierungsansatz mit 30 ul H_2O_2, Verdünnung: 1:10000; 1,5 ug SHG; 500 ug Laktoperoxydase/ml 0,05 m Natriumacetatpuffer pH 5,0

Rechts: Markierungsansatz mit 10 ul H_2O_2, Verdünnung: 1,5 ug SHG; 500 ug Laktoperoxydase/ml 0,05 m Natriumacetatpuffer pH 5,0

Ordinate: Counts pro Minute in 0,01 ml jeder Fraktion

Abszisse: Nummer der Fraktion (jeweils Fraktionen zu 0,8 ml)

Abb. 6

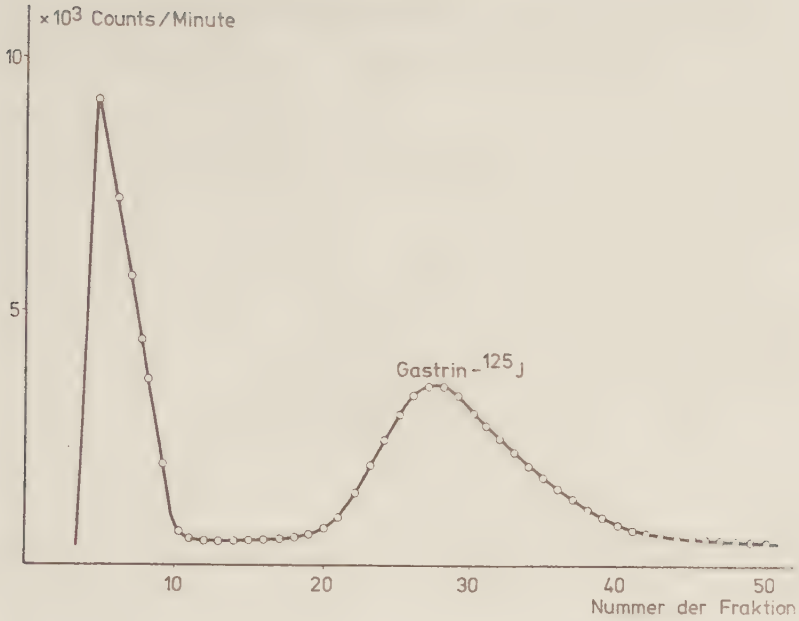
Peak wird nicht durch Gastrinantikörper gebunden. Der zweite Peak enthält das markierte Gastrin (Abb. 7 und 8). Aus dem ersten Peak konnte keine Eichkurve erstellt werden. Zum Ansatz der Eichkurven wurde die Gipfelfraktion des zweiten Peaks benutzt. Vorversuche hatten gezeigt, daß das in dieser Fraktion enthaltene SHG-^{125}J die beste Bindung an den Antikörper aufwies. (Tabelle 1)

Tab. 1

Bestimmung der maximalen Bindung des markierten Gastrins an den Antikörper und der Adsorption an den Ionenaustauscher (Leerwert) nach Rechromatographie über AE 41 Cellulose. Geprüft wurden die Fraktionen 14 - 41 des SHG-^{125}J Peaks (Abb. 8).

Fraktionsnummer	Maximale Bindung des markierten SHG an den Antikörper in Prozent	Adsorption an den Ionenaustauscher (Leerwert) in Prozent
14 - 17	31,9	10,8
18 - 21	31,7	9,2
22 - 25	32,7	7,2
26 - 29	36,4	4,7
30 - 33	43,1	4,2
34 - 37	43,7	3,4
38 - 41	38,8	3,9

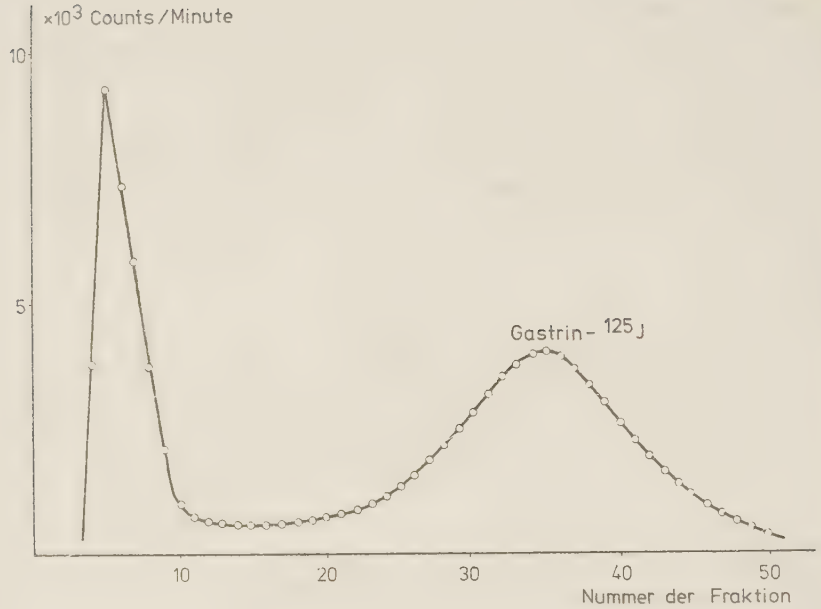
Zum Ansatz der Eichkurve wurden jeweils vier Fraktionen gepoolt, und von jedem Pool 100 ul SHG-^{125}J zum Inkubationsgemisch zugegeben.



Rechromatographie von Gastrin-^{125}J, Markierung nach Chloramin T Methode, über AE 41 Cellulosesäule.

Ordinate: Counts pro Minute in 0,01 ml jeder Fraktion
Abszisse: Nummer der Fraktion (jeweils Fraktionen zu 0,8 ml)

Abb. 7



Rechromatographie von Gastrin-^{125}J, markiert nach enzymatischer Methode, über AE 41 Cellulosesäule.

Ordinate: Counts pro Minute in 0,01 ml jeder Fraktion
Abszisse: Nummer der Fraktion (jeweils Fraktionen zu 0,8 ml)

Abb. 8

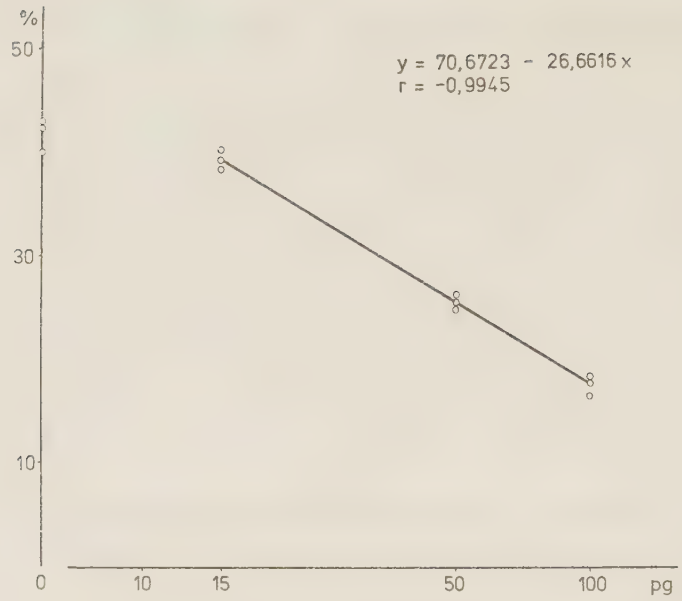
3.5. Prüfung des immunologischen Verhaltens des Gastrin-^{125}J

3.5.1. Eichkurven mit Chloramin T markiertem SHG I-^{125}J

Um einen Maßstab für die immunologische Qualität des mit Hilfe von Laktoperoxydase markierten SHG-^{125}J zu haben, wurden zu jeder Markierungsserie mit enzymatisch markiertem Gastrin eine Eichkurve mit Gastrin-^{125}J erstellt, das unter Verwendung von Chloramin T markiert worden war. Zur Herstellung der Eichkurven wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt und 15, 50 und 100 pg unmarkiertes Gastrin eingesetzt (Abb. 9). Außerdem wurde die Bindung des markierten Gastrins an den Antikörper in Abwesenheit von unmarkiertem Hormon und die Adsorption des Tracerhormons an den Ionenaustauscher bestimmt.

3.5.2. Eichkurven mit Laktoperoxydase markiertem SHG I-^{125}J

Die maximale Bindung des mit Hilfe von Laktoperoxydase markierten Gastrin-^{125}J an den Antikörper 662 lag bei einer Endverdünnung des Antikörpers von 1:100 000 zwischen 40 und 50 %. Eine Abhängigkeit der maximalen Bindung von der spezifischen Aktivität des markierten Gastrins war im untersuchten Bereich nicht festzustellen (Abb. 10). Die maximale Bindung des mit Chloramin T markierten Gastrins lag ebenfalls in dem Bereich von 40 bis 50 %.
Der günstigste Bereich zur Erzielung einer maximalen Steigung im Anfangsteil der Eichkurve liegt bei einer spezifischen Aktivität des enzymatisch markierten Gastrins zwischen 300 und 400 uCi/ug SHG-^{125}J (Abb. 11). Dieser Bereich der spezifischen Aktivität kann mit folgendem Markierungsansatz reproduzierbar erreicht werden:

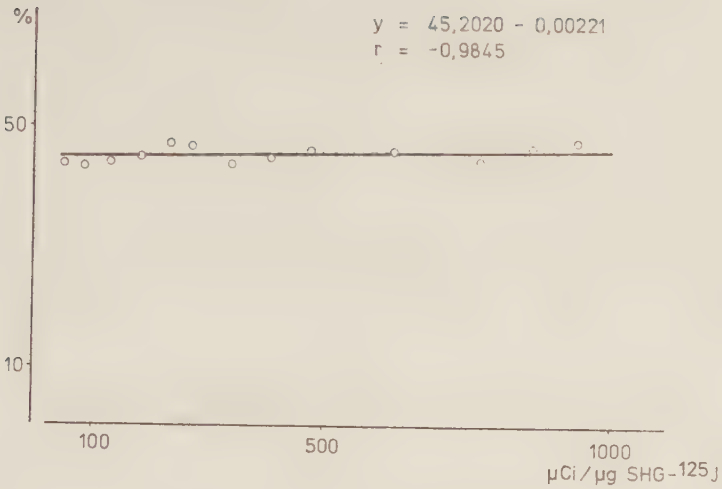


Eichkurve mit SHG-^{125}J, markiert nach Chloramin T Methode

Ordinate: Bindung des SHG-^{125}J an den Antikörper in Prozent der eingesetzten SHG-^{125}J Gesamtmenge

Abszisse: pg Gastrin/Testansatz

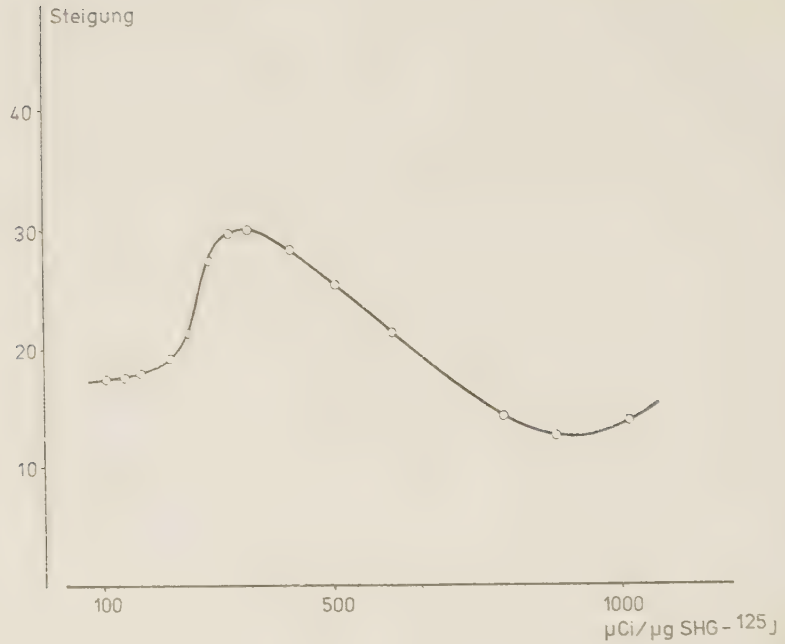
Abb. 9



Beziehung zwischen der spezifischen Aktivität des markierten Gastrins und der maximalen Bindung an den Antikörper

Ordinate: Bindung des SHG-^{125}J an den Antikörper in Prozent der eingesetzten SHG-^{125}J Gesamtmenge
Abszisse: spezifische Aktivität des markierten Gastrins in uCi/ug SHG-^{125}J

Abb. 10



Beziehung zwischen Steigung im Anfangsteil der Eichkurve und spezifischer Aktivität des markierten Gastrins.

Ordinate: Steigung b der Eichkurve ($y = a + \underline{b}x$)
Abszisse: spezifische Aktivität des markierten Gastrins in uCi/ug SHG-^{125}J

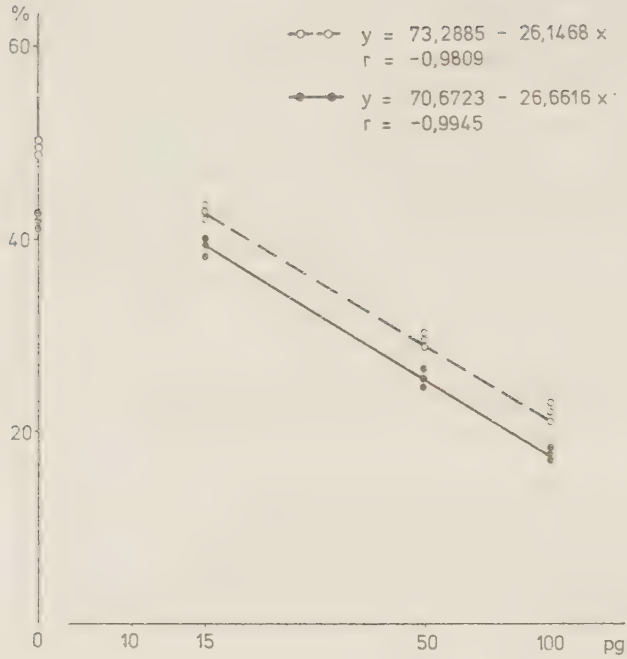
Abb. 11

1. Eingesetzte Gastrinmenge 0,75 ng/15 ul 0,5 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,4
2. 10 ul Laktoperoxydase (500 ug/ml 0,05 m Natriumacetatpuffer pH 5,0)
3. 10 ul H_2O_2, 30 %ig, Verdünnung 1:1000 mit Aqua bidest

Inkubationszeit 15 Minuten bei Zimmertemperatur. Ein Vergleich des Steigungsverhaltens im Anfangsteil der Eichkurve von enzymatisch und mit Hilfe von Chloramin T markiertem Gastrin-^{125}J ergab keinen signifikanten Unterschied.

3.5.3. Eichkurven nach Rechromatographie des SHG I-^{125}J mit AE 41 Cellulose

Die Rechromatographie sowohl des enzymatisch als auch des nach der Chloramin T Methode markierten Gastrins führt zu einer Verbesserung der immunologischen Eigenschaften des Tracers. Die Adsorption des markierten Gastrins an den Ionenaustauscher ist zwischen 1,3 und 4 % geringer, wenn das markierte Gastrin mit der AE 41 Säule rechromatographiert wurde. Die Zunahme der maximalen Bindung an den Antikörper liegt gegenüber dem ungereinigten Gastrin-^{125}J zwischen 9,3 und 11,1 %. Eine Zunahme der Steigung im Anfangsbereich der Eichkurve konnte durch Reinigung von Gastrin-^{125}J (Chloramin T Methode) nicht erzielt werden (Abb. 12). Nach Reinigung von enzymatisch markiertem SHG-^{125}J zeigte die Eichkurve einen signifikant steileren Verlauf (Abb. 13).

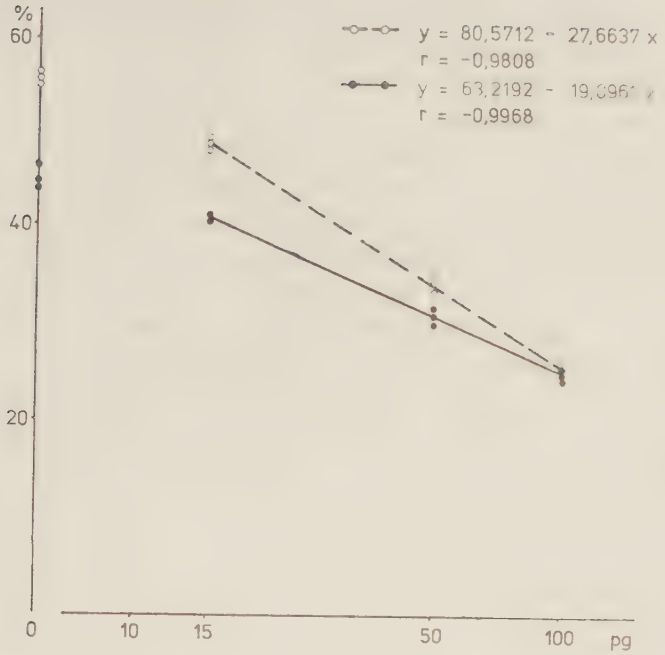


Eichkurven mit SHG-^{125}J, markiert nach Chloramin T Methode (—●—) und zusätzlicher Rechromatographie über AE 41 Cellulose (-○-○-)

Ordinate: Bindung des eingesetzten SHG-^{125}J an den Antikörper in Prozent der SHG-^{125}J Gesamtmenge

Abszisse: pg/Testansatz

Abb. 12



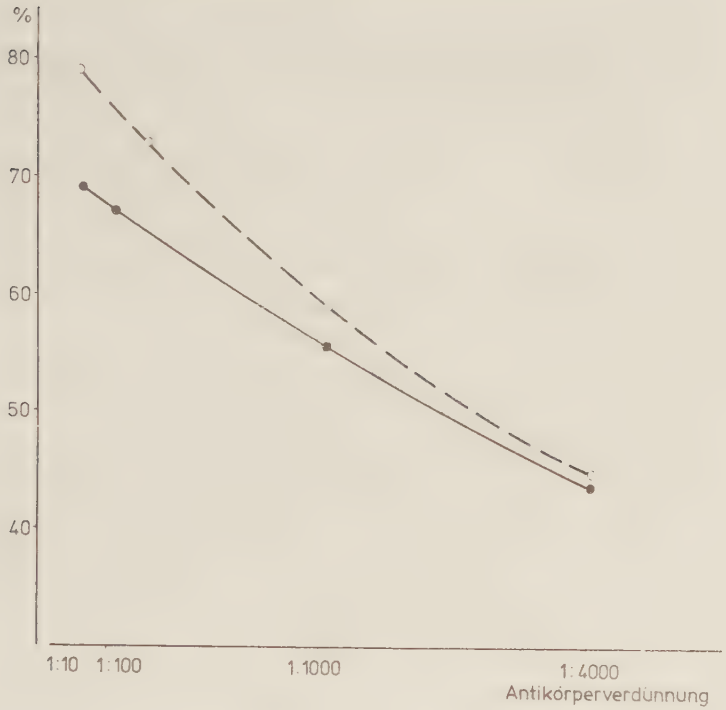
Eichkurven mit SHG-^{125}J, enzymatisch markiert (—•—•)
und mit zusätzlicher Rechromatographie über AE 41
Cellulose (—o—o—)

Ordinate: Bindung des SHG-^{125}J an den Antikörper in Prozent
der eingesetzten SHG-^{125}J Gesamtmenge
Abszisse: pg Gastrin/Testansatz

Abb. 13

3.5.4. Immunologisches Verhalten des markierten Gastrin-^{125}J im Antikörperüberschuß

Bei Antikörperverdünnungen von 1:10 bis 1:1000 ist die Bindung des enzymatisch markierten SHG-^{125}J etwa 10 % größer als die Bindung des nach der Chloramin T Methode markierten Gastrins (Abb. 14). Bei der im Gastrinradioimmunoassay verwendeten Verdünnung des Antikörpers von 1:4000 ist jedoch kein Unterschied bezüglich der maximalen Bindung an den Antikörper festzustellen. Durch die Reinigung des nach beiden Methoden markierten SHG-^{125}J mit AE 41 Cellulose konnte keine vermehrte maximale Bindung des markierten Gastrins an den Antikörper (Verdünnung 1:10) erzielt werden.



Abhängigkeit der Bindung des SHG-^{125}J an den Antikörper von der Verdünnung des Antiserums im Testansatz

—●—● SHG-^{125}J markiert nach Chloramin T Methode
—○—○— SHG-^{125}J markiert nach enzymatischer Methode

Ordinate: Antikörperbindung des SHG-^{125}J in Prozent der eingesetzten SHG-^{125}J Gesamtmenge
Abszisse: Verdünnungsverhältnis des Antikörpers 662

Abb. 14

4. Diskussion

4.1. Radioaktive Markierung von Gastrin I mit ^{125}J unter Verwendung von Laktoperoxydase

Die von Holohan et al. (19) angegebene Markierungsmethode ist mit einigen Modifikationen auch für die Markierung von Gastrin mit ^{125}Jod geeignet. Bei der Ausarbeitung eines Markierungsverfahrens ist zu untersuchen, bis zu welchem Grad die immunologischen Eigenschaften des Tracerhormons durch die Inkorporation von ^{125}Jod verändert werden. Der Einsatz einer geringen Tracermenge im Radioimmunoassay kann durch eine hohe spezifische Aktivität des markierten Hormons erreicht werden. Bei sehr hohen spezifischen Aktivitäten können jedoch viele Degradationsprodukte vorhanden sein, die keine immunologische Wirkung besitzen, so daß die Bindung des markierten Gastrins an den Antikörper unter Umständen schwächer ist als beim Einsatz eines Tracers von geringerer spezifischer Aktivität.

4.1.1. Änderung der eingesetzten Hormonmenge

Die eingesetzte Hormonmenge wurde zwischen 0,05 ug SHG und 1,5 ug SHG/15 ul 0,5 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 verändert. Durch Reduktion der eingesetzten Gastrinmenge im Markierungsansatz konnten spezifische Aktivitäten bis zu 2397,0 uCi/ug SHG-^{125}J (5273,4 uCi/nmol SHG-^{125}J) erreicht werden. Allerdings war ab einer spezifischen Aktivität von 1000 uCi/ug SHG-^{125}J (2200 uCi/nmol SHG-^{125}J) der vollständige Verlust der immunologischen Eigenschaften des markierten Gastrins zu beobachten. Dieser spezifischen Aktivität entspricht der Einbau eines Jodatoms in ein Molekül Gastrin (11). Die maximale Bindung des markierten Gastrins an den Antikörper ist im Bereich von 27,4 uCi/ug SHG-^{125}J (60,28 uCi/nmol SHG-^{125}J)bis 1000 uCi/ug SHG-^{125}J (2200 uCi/nmol

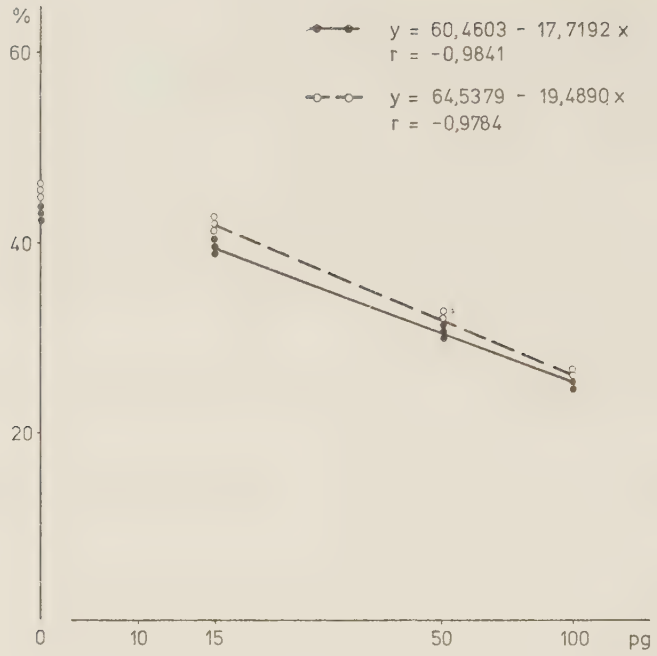
SHG-^{125}J) nicht von der spezifischen Aktivität des Tracerhormons abhängig (Abb. 10). Um aber eine maximale Steigung im Anfangsteil der Eichkurve und damit eine Erhöhung der Empfindlichkeit im unteren Meßbereich zu erzielen, sollte die spezifische Aktivität des markierten Gastrins zwischen 300 und 400 uCi/ug SHG-^{125}J liegen (Abb. 11). Dieser Bereich läßt sich mit einer Hormonmenge von 0,75 ug SHG, 15 ul 0,5 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 im Markierungsansatz am günstigsten erreichen.

4.1.2. Änderung der eingesetzten Laktoperoxydasekonzentration

Die von Holohan angegebene Menge von 50 ug Laktoperoxydase/ml 0,05 m Natriumacetatpuffer pH 5,0 im Markierungsansatz erwies sich als ausreichend. Mit einer Erhöhung der Laktoperoxydasekonzentration um den Faktor 10 ist aber eine Steigerung der spezifischen Aktivität des markierten Gastrins zu erzielen (Abb. 5). Reproduzierbare Veränderungen der immunologischen Eigenschaften konnten durch Veränderung der eingesetzten Laktoperoxydasekonzentration nicht nachgewiesen werden.

4.1.3. Änderung der eingesetzten H_2O_2 Konzentration

Als optimal für die Markierung von Gastrin mit ^{125}Jod erwies sich die von Holohan angegebene H_2O_2 Menge von 10 ul 1:1000 verdünnter 30 %iger Perhydrollösung (Merck). Um mildere Reaktionsbedingungen zu schaffen, wurden stärkere H_2O_2 Verdünnungen im Markierungsansatz eingesetzt. Dabei kam es zum Abfall der spezifischen Aktivität des markierten Gastrins und zu einer Verschlechterung der Eichkurven (Abb. 15). Ebenso unzweckmäßig erwies sich die Verwendung größerer H_2O_2 Mengen.



Eichkurven mit SHG-^{125}J, enzymatisch markiert

-o--o- Markierungsansatz mit 10 ul H_2O
Verdünnung: 1:1000

-●-●- Markierungsansatz mit 10 ul H_2O_2
Verdünnung: 1:10000

Beide Markierungen mit 500 ug Laktoperoxydase/ml 0,05 m Na-Acetatpuffer pH 5,0 und 0,75 ug Gastrin

Ordinate: Bindung des SHG-^{125}J an den Antikörper in Prozent der eingesetzten SHG-^{125}J Gesamtmenge

Abszisse: pg Gastrin/Testansatz

Abb. 15

4.1.4. Änderung der Inkubationszeit

Bei der Ausarbeitung der Methode zur Herstellung von Gastrin-^{125}J wurde untersucht, wie sich die Markierungsdauer (d.h. die Zeit von der Zugabe des H_2O_2 bis zur Zugabe des Natriumdisulfit) auf die immunologischen Eigenschaften des Tracers auswirkt. Die besten Ergebnisse wurden bei der von Holohan angegebenen Markierungsdauer von 15 Minuten erzielt. Eine Verlängerung der Inkubationszeit bis auf 45 Minuten ergab weder für die maximale Bindung des markierten Gastrins an den Antikörper noch für die Steigerung im Anfangsteil der Eichkurve eine Verbesserung.

4.2. Rechromatographie von Gastrin-^{125}J mit AE 41 Cellulose

Mit Hilfe der Rechromatographie des markierten Gastrins über eine mit AE 41 Cellulose gefüllte Chromatographiesäule kann ein hochgereinigter Tracer für das Radioimmunoassay hergestellt werden. Die qualitative Verbesserung zeigt sich vor allem in der erhöhten maximalen Bindung des markierten Gastrins an den Antikörper und im Abfall des Leerwertes (Adsorption an den Ionenaustauscher). Außerdem zeigen Eichkurven mit gereinigtem enzymatisch markiertem Gastrin einen reproduzierbaren Steigungszuwachs im Anfangsbereich der Eichkurve.

4.3. Vorteile der enzymatischen Markierung von Gastrin mit ^{125}J

Die Markierung von Gastrin mit ^{125}J auf enzymatischem Wege wird bei Zimmertemperatur durchgeführt, die Markierung nach der Chloramin T Methode muß im Kühlraum bei 6 Grad Celsius ausgeführt werden. Ein weiterer Vorteil liegt in der längeren Inkubationszeit von 15 Minuten gegenüber 30 Sekunden bei der Chloramin T Methode. Zeitfehler beim Stoppen der Reaktion

bleiben bei der enzymatischen Methode vermeidbar. Eine entscheidende Verbesserung der immunologischen Eigenschaften des markierten Gastrins läßt sich jedoch mit der Markierung nach der enzymatischen Methode nicht erreichen.

5. Zusammenfassung

Durch Modifikation der von Holohan et al. (19) angegebenen Markierungsmethode konnte Gastrin I so jodiert werden, daß die immunologischen Eigenschaften weitgehend erhalten blieben. Die spezifische Aktivität des markierten Gastrins sollte für den Einsatz im Radioimmunoassay zwischen 300 und 400 uCi/ug SHG-^{125}J liegen, da in diesem Bereich die maximale Steigung im Anfangsteil der Eichkurve vorlag, und die maximale Empfindlichkeit im unteren Meßbereich zu erzielen war. Eine entscheidende Verbesserung der immunologischen Eigenschaften des markierten Gastrins ließ sich mit der Markierung nach der enzymatischen Methode gegenüber der Markierung nach der Chloramin T Methode jedoch nicht erreichen.

Die Rechromatographie von enzymatisch und nach der Chloramin T Methode markiertem Gastrin ermöglichte die Herstellung eines hochgereinigten Tracers für das Radioimmunoassay. Die maximale Bindung des markierten Gastrins an den Antikörper war um 9,3 bis 11,1 % größer als bei ungereinigtem Gastrin-^{125}J. Die Adsorption an den Ionenaustauscher konnte durch Rechromatographie des markierten Gastrins über die AE 41 Cellulosesäule reproduzierbar um 1,3 bis 4,0 gesenkt werden. Bei Rechromatographie von enzymatisch markiertem Gastrin-^{125}J zeigte die Eichkurve in ihrem Anfangsbereich einen signifikant steileren Verlauf als bei der Verwendung von Gastrin-^{125}J, das nach der Chloramin T Methode markiert worden war.

6. Literaturhinweise

1. Anderson, J.C., M.A. Barton, R.A. Gregory, G.W. Kenner, J.K. Mac-Leod, J. Preston, R.C. Sheppard and J.S. Morley: The antral hormone gastrin II. Synthesis of gastrin. Nature (London) 204, (1964), 933.

2. Berson, S.A., R.S. Yalow: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature 184, (1959), 1648.

3. Berson, S.A., R.S. Yalow: Nature of immunoreactive gastrin extracted from tissues of the gastrointestinal tract. Gastroenterology 60, (1971), 215.

4. Dale, H.H., P.P. Laidlaw: The physiological action of beta-iminozothylethylamine. J. Physiol. (Lond.) 41, (1910/11), 318.

5. Edkins, J.S.: On the chemical mechanism of gastric secretion. Proc. Roy. Soc. Med. Series B 76, (1905), 376.

6. Emas, S., B. Fyrö: Antral gastrin activity in duodenal and gastric ulcer. Gastroenterology 46, (1964), 1.

7. Erspamer, V., G. Bertaccini, G. DeCarlo, R. Endean and M. Impicciatore: Pharmacological actions of caerulein. Experentia 23, (1967), 702.

8. Feuerle, G., H. Ketterer, W. Creutzfeldt: Erfahrungen mit einem Radioimmunoassay für Gastrin. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 76, (1970), 965.

9. Fritsch, W.-P., Hausamen T.U., Rick, W.: Beziehungen der Serumgastrinkonzentration zur Funktion und Histologie der Magenschleimhaut. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 77, (1971), 507.

10. Fritsch, W.-P.: Die klinische Bedeutung der Serumgastrinbestimmung bei der Ulcuskrankheit. Habilitationsschrift, (1974). Düsseldorf.

11. Ganguli, P.C., W.M. Hunter: Iodination of gastrin. In: Radioimmunoassay Methods, Kirkham, K.E., W.M. Hunter (eds), Edinburgh and London: Churchill Livingstone 1971.

12. Goodfriend, Th.L., L. Levine, G.D. Fasman: Antibodies to bradykinin and angiotensin. A use of carbodiimides in immunology. Science 144, (1964), 1344.

13. Greenwood, F.C., W.M. Hunter, J.S. Glover: The preparation of ^{131}J-labelled human growth hormone of high specific activity. Biochem. J. 89, (1963), 114.

14. Gregory, R.A., H.J. Tracy: The constitution and properties of two gastrins extracted from hog artral mucosa.
I. The isolation of two gastrins from hogantral mucosa.
II. The properties of two gastrins isolated from hog antral mucosa. Gut 5, (1964), 103.

15. Gregory, R.A., H.J. Tracy: Studies on the chemistry of gastrins I and II. In: Gastrin. Grossmann, M.I. (ed), Los Angeles: Univ. of California Press 1966.

16. Greider, M.H., J.E. McGuigan: Cellular localisation of gastrin in the human pancreas. Diabetes 20, (1971), 389 .

17. Halter, F., G.M. Smith: The biological assay of gastrin Acta Hepato - Gastroenterol. 19, (1972), 25.

18. Hensky, J., M.D. Cain: Radioimmunoassay of gastrin in human serum. Lancet 1969 11, 1388.

19. K.N. Holohan, R.F. Murphy, K.D. Buchanan and D.T. Elmore: Enzymic iodination of polypectide hormones for radioimmunoassay. Clin. Ch. Acts 45, (1973), 153-157.

20. Hunter, W.M., Greenwood, F.C.: Preparation of ^{131}J labelled human growth hormone of high specific activity. Nature (Lond.), 194, (1962), 495.

21. Ivy, A.C.: The mechanism of gastric secretion. Surgery 10, (1951), 861.

22. Jaffe, B.M., J.E. McGuigan, W.T. Newton: Immunochemical measurement of the vagal release of gastrin. Surgery 68, (1970), 196.

23. Jeffcoate, S.C.: Radioimmunoassay of gastrin: Specificity of antisera. Scand. J. Gastroent. 5, (1969), 457.

24. Komarow, S.A.: Gastrin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 38, (1938), 514.

25. Lai, K.S.: Studies on gastrin. Gut 5, (1964), 327.

26. Lomsky, R., F. Langr, V. Vortel: Immunohistochemical demonstration of gastrin in the human islets of Langerhans. Nature (Lond.) 223, (1969), 618.

27. McGuigan, J.E.: Antibodies to the carboxyl-terminal tetrapeptide of gastrin. Gastroenterology 53, (1967) 697.

28. McGuigan, J.E.: Immunochemical studies with synthetic human gastrin. Gastroenterology 54, (1968), 1005.

29. McGuigan, J.E.: Gastric mucosal intracellular localization of gastrin by immunofluorescence. Gastroenterology 55, (1968), 315.

30. McGuigan, J.E., W.L. Trudeau: Immunochemical measurement of elevated levels of gastrin in the serum of patients with pancreatic tumors of Zillinger-Ellison variety. New Engl. J. Med. 278, (1968), 1308.

31. McGuigan, J.E.: Experiences with the immunoassay and the fluorescence microscopical localization of gastrin. In: Origin, chemistry, physiology and pathophysiology of the gastrointestinal hormones, Creutzfeldt, W., (ed), Stuttgart: Schattauer 1970.

32. Morley, J.S., H.J. Tracy, R.A. Gregory: Structure-function relationship in the active C-terminal tetrapeptide of gastrin. Nature (Lond.) 207, (1968), 1356.

33. J. Müller, W.-P. Fritsch, W. Rick, T.U. Hausamen: Die radioimmunologische Serumgastrinbestimmung. Med. Welt 24, (1973), Sonderdruck.

34. Müller, J.: Ausarbeitung eines radioimmunologischen Bestimmungsverfahrens zur Messung des Serumgastrinspiegels. Dissertationsschrift, 1973. Düsseldorf.

35. Mutt, V., J.E. Jorpes: Isolation of aspartylphenylalanine amide from cholecystokinin-pancreozymin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 26, (1867), 392.

36. Nilson, G., R.S. Yalow, S.A. Berson: Distribution of gastrin in the gastrointestinal tract of human, dog, cat and hog. Symposium on Frontiers in Gastrointestinal Hormone Research. Special Nobel Symposia Series. Uppsala: Almquist and Wiksell.

37. Odell, W.D., A.C. Chorters, W.D. Davidson, J.C. Thompson: Radioimmunoassay for human gastrin using unconjugated gastrin as antigen. J. Clin. Endocr. 28, (1968), 1840.

38. Persner, L., M.I. Grossman: The mechanism of vagal stimulation on gastric acid secretion. Gastroenterology 28, (1956), 493.

39. Popielski, L.: Beta-Imidazoläthylamin und die Organextrakte. Pflügers Arch. ges. Physiol. 178, (1920), 214.

40. Reeder, D.D., Thompson, J.C.: Effect of hemodialysis on serum gastrin levels in uremic patients. Gastroenterology 60, (1971), 795.

41. Rehfield, J.F., Stadil, F. Rubin, B.: Production and evaluation of antibodies for the radioimmunoassay of gastrin. Scand. J. clin. Lab. Invest. 30, (1972), 221.

42. Rodbard, D., Ruder, H.J., Vaitukaitis, J., Jacobs, H.S.: Mathematical analysis of kinetics of radioligand assays. Improved sensitivity obtained by delayed allition of labeled ligand. J. clin. Endocr. 33, (1971), 343.

43. Schnedorf, J. G., Ivy, A.C.: Failure of histamine and gastrin to provoke gastric secretion in monkeys with anacidity. Proc. Soc. exp. Biol. Med (N.Y.) 36, (1937),192.

44. Smith, G.M., A.J. Lawrence, D.G. Colin-Jones, H.O. Schild: The assay of gastrin using the perfused rat stomach. Brit. J. Pharmacol. 38, (1970), 206.

45. Stadil, F.: Effect of vagotomy and gastrin release during insulin hypoglycaemia in ulcer patients. Scand. J. Gastroent. 7, (1972), 225.

46. Stadil, F., Rehfield, J.F.: Preparation of ^{125}J-labelled synthetic human gastrin I for radioimmunoanalysis. Scand. J. clin. Lab. Invest, (1972), 361.

47. Stremple, J.F., P. Abramoff, C.J. van Oss, St.D. Wilson; E.H. Ellison: Antibodies to synthetic human gastrin I. Lancet 1967 11, 1180.

48. Temperley, J.M., B.H. Stagg: Bioassay and radioimmunoassay of plasma gastrin in a case of Zollinger-Ellison Syndrom. Scand. J. Gastroent. 6, (1970), 735.

49. Thompson, J.C., D.D. Reeder, W.D. Davidson: Studies on the metabolism of gastrin. Symposium on Frontiers in Gastrointestinal Hormone Research. Special Nobel Symposia Series. Uppsala: Almquist and Wiksell.

50. Uvnäs, B., S. Emas, B. Fyrö: The interaction between vagal impulses and gastrin in the control of gastric acid secretion. Amer. J. dig. Dis. 11, (1966), 103.

51. Woodward, E.R., E.S. Lyon, J. Landor, L.R. Dragstedt: The physiology of the gastric antrum, experimental studies on isolated antrum pouches in dogs. Gastroenterology 27, (1954), 766.

52. Yalow, R.S., S.A. Berson: Labelling of proteins - problems and practises. Trans N.Y. Acad. Sci. 28, (1966), 1033.

53. Yalow, R.S., S.A. Bernson: Radioimmunoassay of gastrin. Gastroenterology 58, (1970), 1.

Herrn Professor Dr. med. F. Grosse-Brockhoff, Direktor der 1. Medizinischen Klinik A der Universität Düsseldorf möchte ich an dieser Stelle danken, daß ich an seiner Klinik als Doktorand arbeiten durfte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med T.-U. Hausamen und Herrn Priv. Doz. Dr. med. W.-P. Fritsch. Mit ihrer Hilfe war es mir möglich, grundlegende Kenntnisse der Arbeitsmethoden in einem biochemischen Labor zu erwerben und Erfahrungen auf dem Gebiet des radioimmunologischen Bestimmungsverfahrens zu sammeln. Nur mit ihrer tatkräftigen Unterstützung konnte diese Arbeit entstehen und dafür bin ich beiden außerordentlich dankbar.

Lebenslauf

Am 26. Juni 1951 wurde ich Klaus Dieter Schönrock, als Sohn des Facharztes für Orthopädie Dr. med. Wolfdietrich Schönrock und seiner Ehefrau Evamaria geb. Lammert in Celle geboren.
Von 1958 bis 1959 besuchte ich die Volksschule in Wietze Kreis Celle, anschließend die Volksschule in Düsseldorf bis zum Jahre 1962. Von 1962 bis zum Abitur im Jahre 1970 war ich Schüler des Rethel-Gymnasiums Düsseldorf.
Im Wintersemester 1970/71 begann ich das Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Dort absolvierte ich 1971 das Vorphysikum. Im Sommersemester 1972 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Universität Köln auf. Nach dem Physikum studierte ich vom Sommersemester 1973 bis zum Staatsexamen im Januar 1977 an der Universität Düsseldorf.
Vom 16. 2. 1977 bis zum 30. 6. 1977 war ich als Medizinalassistent in der chirurgischen Klinik der Städtischen Krankenanstalten Düsseldorf Gerresheim tätig. Seit dem 4. 7. 1977 arbeite ich in der medizinischen Klinik des Marien-Hospitals in Duisburg.